

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-044472

(43)Date of publication of application : 15.02.2000

(51)Int.Cl.

A61K 31/35

A61K 31/70

// A61K 35/78

C07D311/62

C07H17/065301 (0) 3rd group

(21)Application number : 10-214996

(71)Applicant : KIKKOMAN CORP

(22)Date of filing : 30.07.1998

(72)Inventor : ARIGA TOSHIKI

IWAI YUKIHIKO

KATAOKA SHIGEHIRO

YAMATSUGU NOBUYUKI

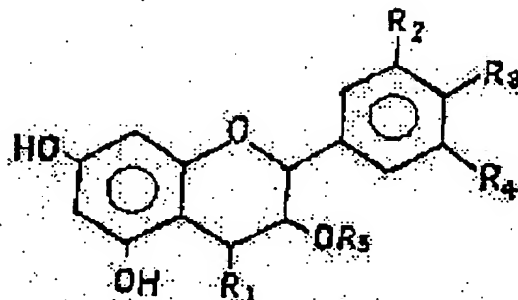
GUYUEN VAN CHUEN

(54) MEDICINE FOR PREVENTING OR TREATING DIABETIC COMPLICATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject medicine capable of controlling a blood glucose level, a degree of blood hemoglobin saccharification, etc., at low values, respectively, and useful for preventing and treating the crises and advances of various diabetic complications by compounding as an active ingredient a proanthocyanidin oligomer which is originated from a plant and is scarcely toxic.

SOLUTION: This medicine for preventing or treating diabetic complications contains one or more kinds of proanthocyanidin oligomers preferably selected from the oligomers comprising 2 to 100 molecules of flavane-3,4-diol of the formula (R₁ is H or OH; R₂ to R₄ are each H, OH or the like; R₅ is H, galloyl or the like) as constituting units as an active ingredient. The proanthocyanidin oligomers are preferably extracts extracted from the seeds, pericarps or squeezed residues of grapes. The medicine is orally or parenterally administered for preventing or treating diabetic cataract, etc., for example, at a daily dose of about 0.1-100 mg for an adult as the active ingredient in the case of an injection.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

14.06.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

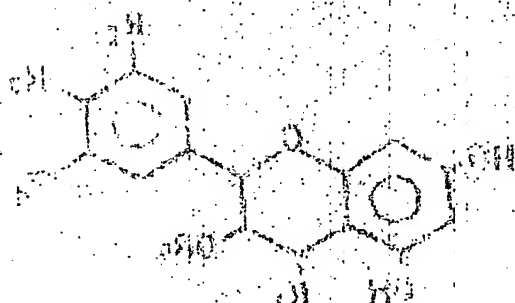
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

Applicant: KAWAUCHI KENJI
Inventor: KAWAUCHI KENJI
Attorney: KAWAUCHI KENJI
KAWAUCHI KENJI
KAWAUCHI KENJI
KAWAUCHI KENJI
KAWAUCHI KENJI

Patent No. 3,000,000
Date of registration: 1998.03.01

COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING DIABETIC COMPLICATION



THE INVENTION RELATES TO A COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING DIABETIC COMPLICATION. THE COMPOSITION IS A FLAVONE DERIVATIVE, SPECIFICALLY A 3,4-DIHYDROXYFLAVONE DERIVATIVE, WITH SUBSTITUENTS R1, R2, R3, AND R4. THE COMPOSITION IS EFFECTIVE FOR TREATING OR PREVENTING DIABETIC COMPLICATION, SUCH AS DIABETIC NEPHROPATHY, DIABETIC RETINOPATHY, AND DIABETIC NEUROPATHY. THE COMPOSITION IS A FLAVONE DERIVATIVE, SPECIFICALLY A 3,4-DIHYDROXYFLAVONE DERIVATIVE, WITH SUBSTITUENTS R1, R2, R3, AND R4. THE COMPOSITION IS EFFECTIVE FOR TREATING OR PREVENTING DIABETIC COMPLICATION, SUCH AS DIABETIC NEPHROPATHY, DIABETIC RETINOPATHY, AND DIABETIC NEUROPATHY.

(43)公開日 平成12年2月15日(2000.2.15)

(51) Int.Cl.:

A 6 1 K 31/35

識別記号

ABL

AAA

ACV

FI

A 6 1 K 31/35

テーマト(参考)

ABL

4 C 0 5 7

AAA

4 C 0 6 2

ACV

4C086

4C088

C

116

31/70

// A 6 1 K 35/78

31/70

35/78

審査請求 未請求 請求項の数 3 OL (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平10-214996

(22) 出題目

平成10年7月30日(1998.7.30)

(71)出願人 000004477

キッコーマン株式会社

千葉県野田市野田250番地

(72) 堯明者 有賀 敏明

千葉県野田市野田339番地 キックコーマン

株式会社内

(72)発明者 岩井 幸彦

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

(72) 發明者：片岡 茂博

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン

株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 糖尿病性合併症の予防または治療薬剤

(57) 【要約】

【課題】植物体にその存在が知られている化合物により糖尿病性合併症の予防または治療を行なう。

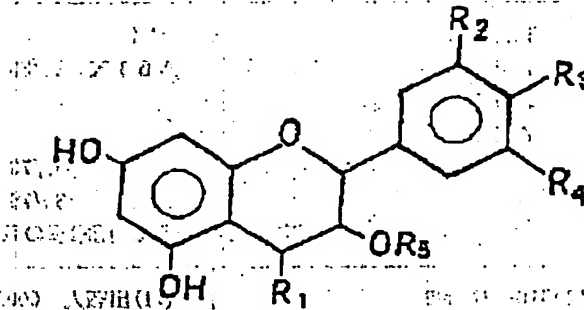
【解決手段】プロアントシアニジンオリゴマーを有効成分とすることを特徴とする糖尿病性合併症の予防または治療剤を提供する。

[illegible]

【特許請求の範囲】

【請求項1】プロアントシアニジンオリゴマーを有効成分とすることを特徴とする糖尿病性合併症の予防または治療薬剤。

【化1】



(式中、 R_1 は水素またはヒドロキシル基、 R_2 、 R_3 、 R_4 は、同一でも異なってもよく、水素原子、ヒドロキシル基またはメトキシル基、 R_5 は水素、ガロイル基またはグリコピラノシル基を示す。)で表されるフラバン-3, 4-ジオールを構成単位として結合した2-100量体の群より選ばれた少なくとも一種である請求項1記載の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤。

【請求項3】プロアントシアニジンオリゴマーが、ブドウ果実の種子、果皮または搾汁粕より抽出して得られる抽出物である請求項1または2記載の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、プロアントシアニジンオリゴマーを有効成分とする糖尿病性合併症の予防または治療薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】糖尿病に関しては、特殊な慢性的合併症例えば糖尿病性白内障、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症などの難治性疾患が発生する場合がある。従来、糖尿病に伴うこれらの難治性疾患の予防および治療法として、十数件の方法が知られている。例えば、エイコサペンタエン酸または/およびドコサヘキサエン酸、もしくはそのエステルを用いる方法(特開昭60-248610号)、スピロ-3-ヘテロアゾリジン化合物を用いる方法(特公平03-72226号)、スピロインデン類およびスピロ-1, 2-ジヒドロナフタレン類を用いる方法(特開昭60-209572号)、ピロロキノリンキノンまたはその誘導体を用いる方法(特開昭63-48215号)、ヒダントイン誘導

【請求項2】プロアントシアニジンオリゴマーが、一般式:

【化1】

体を用いる方法(特公平03-72227号)、ローザニン誘導体を用いる方法(登録2608097、同1975937、特開平04-9385、同04-173790)、テトラヒドロチオフエン誘導体を用いる方法(特開平05-32659)、1, 4-ベンゾチアジン-2-酢酸誘導体を用いる方法(登録2729430)、スクシニアミド酸誘導体を用いる方法(特開平07-82259)、ビオチニアミド誘導体を用いる方法(特開平07-2867)、2-置換ベンゾチアゾール誘導体を用いる方法(特開平08-208631)およびイミダゾピロキノリン類を用いる方法(特開平10-45592)などが知られている。しかし、これらの化合物は、非植物体より得られるもので、人体に対する毒性、安全性の面で必ずしも満足するものではない。

【0003】

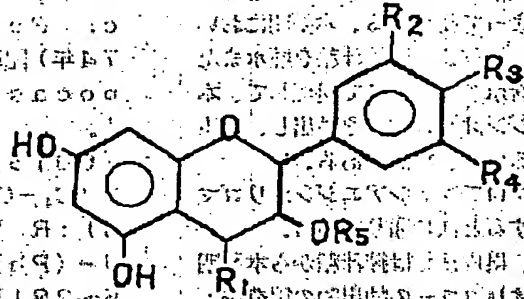
【発明が解決しようとする課題】本発明は、植物体にその存在が知られている化合物により糖尿病性合併症の予防および治療を行なうことを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、ぶどう果実の種子、果皮または搾汁粕より抽出して得られるプロアントシアニジンオリゴマーが、糖尿病性合併症の予防および治療剤として効果を奏し、課題を解決できることを発見し、この知見に基づいて本発明を完成した。すなわち本発明は、プロアントシアニジンオリゴマーを有効成分とすることを特徴とする糖尿病合併症の予防または治療薬剤である。また本発明は、プロアントシアニジンオリゴマーが、一般式:

【化2】

【化2】



(式中、 R_1 は水素またはヒドロキシル基、 R_2 、 R_3 、 R_4 は、同一でも異なっているもよく、水素原子、(ヒドロキシル基またはメトキシル基)、 R_5 は水素、ガロイル基またはグリコピラノシル基を示す。)で表されるフラバン-3, 4-ジオールを構成単位として結合した2~100量体の群より選ばれた少なくとも一種である前記の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤である。また本発明は、プロアントシアニジンオリゴマーが、プロアントシアニジンオリゴマーが、ブドウ果実の種子、果皮または搾汁粕より抽出して得られる抽出物である前記の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤である。

【0005】本発明の特徴は、プロアントシアニジンオリゴマーを有効成分としている糖尿病性合併症の予防または治療薬剤である。そして本発明のプロアントシアニジンオリゴマーには、当該物質もしくはその塩化物の他に、当該物質の含有物、例えば、当該物質を含有する植物体もしくはそれらの破砕物、植物体から抽出して得られる抽出物もしくはそれらの精製物をも含むものとする。さらにプロアントシアニジンオリゴマーの各種混合物もしくはプロアントシアニジンオリゴマーとその含有物との混合物をも含むものである。そして、それらのものは製造法の如何を問わないものとする。

【0006】前記の植物としては、本発明の目的を達成できるものであればどのような植物でもよいのであるが、具体的には、ブドウ、アズキ、トチ、マツ、カシ、ミチヤナギ、ヤマモモ、大麦、麦芽、メヒルギ、オウライ、二十日大根、紫蘇、キャベツ、グリアなどが挙げられる。また植物体としては、本発明の目的を達成できる部分であれば、どの部分、例えば、花、実、種子、果実もしくはそれらの果肉または皮類、および根、樹木、樹皮、葉などを使用してもよい。それらは乾燥したもの、生のもの、どちらでもよい。更に、果実のジュース類もしくはリング酒、ブドウ酒などの果実酒、ビール類、またはそれらの製造の際副産物として生成する粕類、または植物体の加工物なども挙げられる。なお、本発明の植物体としては、ブドウ果実の種子、果皮、または搾汁粕を使用するのが、特に好適である。そして、搾汁粕としては、ジュース類の製造時のもの、ブドウ酒製造時のものなどが挙げられる。

【0007】プロアントシアニジンオリゴマーの具体例

としては、フラバン-3-オールもしくはフラバン-3, 4-ジオールまたはフラバン-4-オールなどを母骨格とする化合物(母骨格自体およびそれらの各種誘導体)を構成単位として縮合もしくは重合により結合した化合物群(化学的合成法で製造される各種重合体もしくは縮合体、各種植物体中に存在する縮合型タンニン、また植物体を加水分解処理することによりシアニジン型、デルフィニジン型、ペラルゴニジン型などの各種アントシアニジン化合物などを生成するものなど)を例として挙げる事ができる。なお、前記化合物群の中でも、前記構成単位の2量体、3量体、4量体、さらには30量体以上の高分子のプロシアニジン型、プロデルフィニジン型、プロペラルゴニジン型などの各種アントシアニジン化合物群およびそれらの立体異性体もしくは各種誘導体が好適なものである。また、前記の製造法として、化学的もしくは酵素的合成法、植物体、微生物体からの抽出法などを挙げる事ができる。

【0008】前記の化合物の中でも、化合物自体の溶解性、また薬剤の生体吸収、局在作用もしくは活性などから、プロアントシアニジンオリゴマーとしては、前記一般式(1)で表されるフラバン-3-オールもしくはフラバン-3, 4-ジオールを構成単位として結合した2~30量体が好ましい。その中でも2~10量体が特に好ましい。したがって、本発明の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤は、前記のような化合物群、好適には前記の2~30量体から選択された少なくとも1種以上を有効成分とするものである。

【0009】ここで、本発明のプロアントシアニジンオリゴマーにつき、さらに具体的に示す。前記一般式で表されるフラバン-3-オールもしくはフラバン-3, 4-ジオールを構成単位として結合した2~30量体などのプロアントシアニジンオリゴマーは、公知の化学的もしくは酵素的合成法あるいは各種植物体からの抽出法などにより得ることができる。前記抽出法の場合については、例えば、各種植物体もしくはその破砕物などを溶媒を用いて抽出処理し、得た抽出物をさらに液体クロマトグラフィーなどにより分別精製するか、あるいは植物体を原料とした果実酒、ビールなどの二次加工品をプロアントシアニジンオリゴマーの選択的吸着剤で処理して、該プロアントシアニジンオリゴマー区分を濃縮し、濃縮

物をさらに向流分配法、液体クロマトグラフィーなどにより分別精製することによって得られる。本発明においては、ブドウ果実の種子、果皮または搾汁粕を熱水または含水エタノールまたは含水アセトンにて処理して、本発明のプロアントシアニンオリゴマーを抽出し、抽出物または混合物として得るのが、好適である。

【0010】そして各種プロアントシアニンオリゴマーおよびその製法を例示すると次の通りである。

(1) ブドウ果実の種子、果皮または搾汁粕から本発明のプロアントシアニンオリゴマーの抽出物の製造法：公知の方法（特開平3-200781号公報参照）に従えばよい。例えば、ブドウ果実の種子、果皮または搾汁粕を70℃以上、好ましくは70～120℃、特に好ましくは80～100℃で熱水抽出を行なう。その際、使用する水は、種子、果皮または搾汁粕に対して、通常、1～20倍量（v/w）、好ましくは、3～10倍量である。抽出時間は、抽出量が最大になるように適宜選択されるが、通常は、10分～4時間、好ましくは15分～2時間である。本発明においては、この段階での抽出物、その乾燥物、精製物（部分精製物をも含む）を本発明のブドウ果実の種子、果皮または搾汁粕の抽出物としてもよいが、更に次の操作を施して当該抽出物とするのが好適である。すなわち、この熱水抽出の際、熱水抽出処理前に、70℃未満、好ましくは、20～70℃で、原料と1～20倍量（v/w）、好ましくは3～10倍量の水とを、5分～4時間、好ましくは10分～2時間、接触させ、原料に含有する糖などの夾雑物を除去してから、本発明のプロアントシアニンオリゴマーを抽出すると、高純度の当該物が得られる。この場合、得られた本発明のプロアントシアニンオリゴマーは、各種当該物の混合物である。この抽出物は、それ自体、本発明のプロアントシアニンオリゴマーであるが、その後、公知の各種操作により乾燥してもよい。また、各種の精製操作を行なって各種精製段階の精製物（部分精製物を含む）を得てもよい。本発明においては、前記のもの全てを、本発明の当該抽出物と定義する。

【0011】(2) 2量体プロシアニンB-2（C₄-C₈結合Catechin-Catechin）、C₄-C₈結合の2量体プロシアニン（C₄-C₈結合Catechin-Afzelechin）：本発明者らのアグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー（Agric. Biol. Chem.）第45巻、2709～2712頁（1981年）記載の方法で、アズキ（*Vigna angularis* Ohwi et Ohashi）の70%水性アセトン抽出物をボリアミドC-200およびセファデックスLH-20のカラムを用いた液体クロマトグラフィーにより分別精製することにより得られる。

【0012】(3) 2量体プロアントシアニンA-2：D. Jacquesらのジャーナル・オブ・ケミカ

ル・ソサイティー・パーキンI（J. Chem. Soc. Perkin I）2663～2671頁（1974年）記載の方法でトチ（*Aesculus hippocastanum*）の実の殻を原料として得られる。

【0013】(4) C₄-C₈結合の2量体プロシアニン（C₄-C₈結合Catechin-Catechin）：R. W. Hemingwayらのフィトケミストリー（Phytochemistry）第22巻、275～281頁（1983）記載の方法でマツ（*Lobolobly pine*）の樹皮を原料として得られる。

【0014】(5) C₆-C₈結合の2量体プロデルフィニン（C₆-C₈結合Gallocatechin-Catechin）：Byung-Zun Ahnらのアーカイブ・デル・ファーマシー・ウント・ペリヒテ・デル・ドイチュン・ファーマゾイティシェン・ゲゼルシャフト（Arch. Pharmaz.）666～673頁（1970年）記載の方法でカシ（Oak）の樹皮を原料として得られる。

【0015】(6) プロシアニンB-1-没食子酸エステル（C₄-C₈結合Catechin gallate-Catechin）、プロシアニンB-1-没食子酸エステル（C₄-C₈結合Catechin gallate-Catechingallate）：野中らのフィトケミストリー（Phytochemistry）第21巻、429～432頁（1982）記載の方法でミチヤナギ（*Polygonum multiflorum*）の根を原料として得られる。

【0016】(7) 2量体プロデルフィニンB-2-没食子酸エステル（C₄-C₈結合Gallocatechin gallate-Gallocatechin gallate）：野中らのフィトケミストリー（Phytochemistry）第22巻、237～241頁（1983年）記載の方法でヤマモモ（*Myrica arubra*）の樹皮を原料として得られる。

【0017】(8) C₄-C₈結合の2量体プロベラルゴニン（C₄-C₈結合Afzelchin-Catechin）、C₄-C₈結合の3量体プロデルフィニン（C₄-C₈結合Gallocatechin-Gallocatechin-Catechin）：I. McMurrroughらのジャーナル・オブ・サイエンス・オブ・フード・アグリカルチャー（J. Sci. food Agric.）第34巻、62～72頁（1983年）記載の方法により大麦および麦芽を原料として得られる。

【0018】(9) 2量体プロシアニンB-4ラムノサイド：メヒルギの皮部を原料として特開昭59-59638号記載の方法で得られる。

【0019】(10) C₄-C₈結合の2量体プロベラルゴニン [C₄-C₈結合Afzelchin-Gall

ocatechin (4-O-methyl)] : F. D. Monacheらのアナリ・デイ・キミカ〔Ann. Chim. (Rome)〕第57巻、1364～1371頁(1967年)記載の方法によりオウラティー(Ouratea)の根の皮を原料として得られる。

【0020】(11) C_4-C_8 結合の4量体プロシアニジン(C_4-C_8 結合Catechin-Catechin-Catechin-Catechin) : A. G. H. Leaのジャーナル・オブ・サイエンス・オブ・フード・アグリカルチャー(J. Sci. Food Agric.)第29巻、471～477頁(1978年)記載の方法で、リング酒をセファデックスLH-20で処理して得られるプロアントシアニジンの濃縮物を、酢酸エチルおよび水を用いた向流分配法並びにセファデックスLH-20のカラムを用いた液体クロマトグラフィーにより分別精製することによって得られる。

【0021】合成法については、例えば、以下の如くである。

(12) 2量体プロシアニジンB-3(C_4-C_8 結合Catechin-Catechin)、2量体プロシアニジンB-4(C_4-C_8 結合Catechin-Catechin) : G. Fonknechtenらのジャーナル・オブ・インスティテュート・ブルーイング(J. Inst. Brew.)第89巻、424～431頁(1983年)記載の方法により、ジヒドロケルセチンおよびカテキンまたはエピカテキンを原料として合成法で得られる。また、R. Eastmondのジャーナル・オブ・インスティテュート・ブルーイング(J. Inst. Brew.)第80巻、188頁(1974年)記載の合成法によって得られる。

【0022】上記の他に、化学合成法によってプロシアニジン2量体(A-1)プロデルフィニジン2量体、プロシアニジン3量体、プロシアニジン4量体なども得ることができる。

【0023】前記の方法により、本発明のプロアントシアニジンオリゴマーは、液状もしくは半固形状の形態でも得られるが、さらに凍結乾燥などを行なうことにより粉末形態として得ることができる。

【0024】また、医薬として許容される、前記プロアントシアニジンオリゴマーの塩をも本発明の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤として用いることができる。

【0025】その塩としては、例えば、アルカリ金属塩(例えばナトリウム塩、カリウム塩など)、アルカリ土類金属塩(カルシウム塩など)、アンモニウム塩、エタノールアミン塩、トリエチルアミン塩、ジシクロヘキシルアミン塩などが挙げられる。

【0026】(投与方法) 本発明の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤は、例えば糖尿病性白内障、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症などの糖尿病に伴うこれらの難治性疾患の予防および治療のため、経

口的あるいは非経口的に適宜使用される。すなわち、経口、静脈、腹腔内の投与によっては勿論のこと、点眼によっても著しい治療効果を表すものである。

【0027】(製剤化) 製剤の形態としては、例えば錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などの固形剤、または点眼剤、注射剤などの液剤などいずれの形にも公知の方法により適宜調製することができる。これらの製剤には通常用いられている結合剤、崩壊剤、増粘剤、分散剤、再吸収促進剤、矯味剤、緩衝剤、界面活性剤、溶解補助剤、保存剤、乳化剤、等張化剤、安定化剤、pH調製剤および賦形剤などを適宜使用してもよい。

【0028】(投与量(本発明では以下用量という)) 本発明の目的における本発明のプロアントシアニジンオリゴマーの用量は、その種類、その剤型、また患者の年齢、体重、適応症状などによって異なるが、例えば注射剤の場合、成人1日1回0.01～1000mg、好ましくは0.1～100mg程度、内服剤の場合は、成人1日数回、一回量約0.1～4000mg、好ましくは1～3000mg程度投与するのがよい。点眼剤の場合は、濃度0.01～10%(w/w)、好ましくは0.5～2%(w/w)程度のものを1日1～5回、好ましくは2～5回程度1回につき1～2滴点眼するのがよい。本発明においては、本発明の糖尿病性合併症の予防または治療薬剤に、別種の薬効を奏する成分を適宜含有させてもよい。

【0029】なお、前記経口投与の場合に、本発明のプロアントシアニジンオリゴマーを健康食品として利用することもできる。また、飲食品に添加して、その飲食品を飲食するという形態を採用することもできる。前者の場合、プロアントシアニジンオリゴマーの飲食品に添加する量は特に限定されないが、後者の場合は、通常0.01～5%(w/w)、好ましくは0.5～2%(w/w)である。

【0030】試験例1

2量体プロシアニジンB-3(C_4-C_8 結合Catechin-Catechin)の合成：

R. Eastmondの方法

(J. Inst. Brew.) 80巻、188頁、1974年に準じ、(±)-ジヒドロケルセチン50g、(+)-カテキン50gおよび水素化ホウ素ナトリウムを原料として、合成反応を行なった。反応終了後、酢酸にてpH5.0に調整し、酢酸エチルにて抽出操作を行なった。得られた抽出液を減圧蒸留し、得られた濃縮物をセファデックスLH20(φ8×65cm)を担体とするカラムに掛けた。エタノールを展開溶媒とするカラムクロマトグラフィーにて分画し、溶出液量9～13Lの画分を分取することにより、2量体プロシアニジンB-3画分を得た。この画分を有賀らの方法(Agric. Biol. Chem.; 52巻、2717～2722, 1988年)に準じ、逆相系シリカゲル高速液体ク

ロマトグラフィ（カラム：μBondapak C₁₈ (50×300mm)、展開溶媒：7.5%ミタノール；検出：OD_{280nm}）にて精製した。得られた目的の溶出面分を凍結乾燥することにより、5.11gの2量体プロシアニジンB-3を得た。

【0031】試験例2

ブドウ果実の種子からのプロアントシアニジンオリゴマーの抽出物の製造：白ブドウ（品種：ミラトルガウ）の種子1kgに5Lの水を加え、55℃で2時間、撹拌・洗浄後、さらに種子を水5Lにて完全に洗浄した。得られた洗浄種子を蒸留水5Lで90℃、3時間抽出した。粗抽出液を常法により濾過し、得られた清澄液をBrix濃度10まで濃縮し、一晩静置した。生じた沈殿を遠心分離により除去し、得られた清澄液を濃縮した後、凍結乾燥し、27.2gのプロアントシアニジンオリゴマー抽出物（含有量：全フラバノールとして85.4% (w/w)）を得た。なお、プロアントシアニジンオリゴマー含有量の分析は、次のように行なった。まず、R. B. Broadhurstらのジャーナル・オブ・フーズ・アンド・アグリカルチャー（J. Sci. Food Agric.）、第29巻、788～798頁（1978年）記載の方法に従い測定し、次いで、S.

実施例1

（カプセル剤の調製）

試験例1で得た2量体プロシアニジンB-3 100mg、乳糖 160mg、トウモロコシ澱粉 40mg以上を1カプセル分としてカプセルに充填した。

実施例2

（錠剤の調製）

試験例2で得たプロアントシアニジンオリゴマー抽出物 100mg、乳糖 70mg、トウモロコシ澱粉 1.7mg、結晶セルロース 10mg、ステアリン酸カルシウム 3mg以上を1錠分として錠剤化した。

【0036】実施例3

（内服薬の調製）プロアントシアニジン（含有量9.5%、キッコーマン社製）600mg/kgとなるように注射用蒸留水に懸濁し、内服薬を調製した。

【0037】実施例4

（糖尿病性合併症の予防および治療効果確認試験）糖尿病ラット18匹を6匹づつ（A）対照群、（B）プロシアニジンB-3投与群（対飼料0.5%）、（C）プロアントシアニジン（含有量9.6%）投与群（対飼料0.5%）に分け、12週間飼育した。その間、糖尿病性白内障の進行状況を経日的に観察評価して白内障抑制効果の確認試験した。また12週間後ラットを解剖し、血糖値の分析、血中ヘモグロビン糖化率の測定、血中（血漿中）過酸化脂質の分析を行なった。

Kitaoらの方法（Biosci. Biotech. Biochem.、57巻、2010～2015頁、1993年）に従い、単量体のカテキン類の含量を測定した。前者の測定値から後者の測定値を差し引くことによりプロアントシアニジンオリゴマー含有量を算出した。

【0032】試験例3

単回投与毒性試験

（試験方法）5週齢、雌雄、Crj: ICRマウス（雄マウス平均体重27g、雌マウス平均体重22g）を用い（5匹/群）、前記試験例1および試験例2の方法と同様な方法で製造した2量体プロシアニジンB-3試料およびプロアントシアニジンオリゴマー抽出物について、各々2g/kgを別々の雌雄マウスにおのおの強制単回経口投与後14日観察した。なお、対照として蒸留水のみを雌雄マウスにおのおの同様に投与した。試験期間終了後、全例の病理解剖を行い、全身各臓器の異常の有無を確認した。

【0033】（試験結果）前記当該物の投与で死亡動物はなく、雄雌マウスはなんら臨床症状を示さず、試験期間中順調な体重増加を示した。また、試験期間終了後の全例の病理解剖で、なんら異常は認められなかった。

【0034】

試験例3で得た2量体プロシアニジンB-3 100mg、乳糖 160mg、トウモロコシ澱粉 40mg以上を1カプセル分としてカプセルに充填した。

【0035】

試験例4で得たプロアントシアニジンオリゴマー抽出物 100mg、乳糖 70mg、トウモロコシ澱粉 1.7mg、結晶セルロース 10mg、ステアリン酸カルシウム 3mg以上を1錠分として錠剤化した。

【0038】（なお、1）糖尿病ラットの作製、2）白内障抑制効果の確認試験、3）血糖値の分析、4）糖化ヘモグロビンの分析（血中ヘモグロビン糖化率の測定）、5）過酸化脂質の分析は、以下の方法により実施した。

【0039】1）糖尿病ラットの作製法：Wistar系ラット（雄、10週齢、体重270g）にストレプトゾトシン（Sigma社製）を体重1kg当たり50mgを常法により腹腔内投与し、糖尿病ラットを作製した。

【0040】2）白内障抑制効果確認試験法

ラットの水晶体の白濁度を目視にて0～9の10段階で評価した。

0→変化なし

1→水晶体赤道部に空泡状変化が少し起こる

2→水晶体赤道部に空泡状変化が起こる

3→水晶体表面の中央部にまで混濁が少し起こる

4→水晶体表面の中央部にまで混濁が起こるが、眼底は透視できる

5→水晶体表面全体に混濁が広がり、眼底も透視できない

7→水晶体の核の白濁が少し起こる

8→水晶体の核が白濁する

9→水晶体全体が完全に白色化する。

【0041】3) 血糖値分析方法: 酵素グルコースオキシダーゼを利用する方法により、常法により血中のグルコース濃度を測定した。

【0042】4) 糖化ヘモグロビン分析法

常法によりアフィニティークロマトグラフィー法を用い、血中のヘモグロビン糖化率を測定した。

【0043】5) 過酸化脂質分析法

TDA (チオバルビツール酸) を用い、血中の過酸化脂質を定量し、測定した。

【0044】結果を表1、表2および表3に示す。表1～表3の結果から、プロシアニジンB-3投与群やプロアントシアニジン投与群は、対照に比し、糖尿病性白内障の発症が抑制されており、血糖値、血中ヘモグロビン糖化率、血中過酸化脂質も低く、種々の糖尿病性合併症の発症、進行の予防と治療に有効であると判定される。

【0045】

表1 糖尿病ラットの糖尿病性白内障の進行経過

(日)	5	6	7	8	9	10	11
対照	0.08	0.08	0.58	0.92	2.58	3.33	5.08
プロシアニジン	0.08	0.08	0.08	0	0.83	1.33	2.33
B-3投与群	0	0.8±8	2.8				
プロアントシアニジン投与群	0	0	0	0	0.75	1.33	2.17

(注1) 評点: 6匹のラットの左右の水晶体の白濁度の平均値。

【0046】

表2 糖尿病ラットの血糖値とヘモグロビン糖化率

	血中グルコース (mg/dl)	糖化ヘモグロビン (%)
対照	659.7±60.1 (a)	21.15±1.08 (d)
プロシアニジン	530.2±92.1 (b)	19.62±1.33 (e)
B-3投与群		
プロアントシアニジン投与群	527.1±99.3 (c)	19.56±1.38 (f)

(注1) 分析値: 平均値±標準偏差 (n=6)

(注2) 有意差検定結果: aとb (p<0.01)、aとc (p<0.01)

dとe (p<0.05)、dとf (p<0.05)

【0047】

表3 糖尿病ラット血漿中の過酸化脂質

	過酸化脂質 (nmol MDA/ml 血漿)
対照	13.50±4.42 (a)
プロシアニジン	8.22±3.57 (b)
B-3投与群	
プロアントシアニジン投与群	7.97±3.68 (c)

(注1) 分析値：平均値±標準偏差 (n=6)

(注2) 有意差検定結果：aとb (p<0.01)、aとc (p<0.01)

(注3) MDA：マロンジアルデヒド

【0048】実施例5

糖尿病性合併症の治療抑制効果確認試験

糖尿病ラットを10匹づつ、(A) 対照群、(B)

(+) -カテキン (東京化成製) 投与群 (対飼料0.1

%添加)、(C) プロシアニジンB-3 (試験1で調

製) 投与群 (対飼料0.1%添加)、(D) プロアント

シアニジン (グラヴィノール・スーパー、含有量96

%, キッコーマン社製) 投与群 (対飼料0.1%) の4

表4 糖尿病ラットの血糖値

	血中グルコース (mg/dl)
対照	665.0±60.8 (a)
(+) -カテキン投与群	655.8±85.0
プロシアニジンB-3投与群	618.6±69.1 (b)
プロアントシアニジン投与群	615.2±65.5 (c)

(注1) 分析値：平均値±標準偏差 (n=10)

(注2) 有意差検定結果：aとb (p<0.05)、aとc (p<0.05)

【0051】実施例6

(糖尿病マウスを用いた食後過血糖抑制試験) 市販の糖尿病マウス (KKay Jcl、13週齢/日本クレア社製) (n=5) を、本試験に先立ち、20時間絶食させ (水は可)、胃ゾンデを用いて、検体 (実施例3で調製した内服薬) を強制的に投与 (投与量：600mg/kg・マウス体重の割合となる量とした) し、更に30分後トウモロコシ澱粉の懸濁液 (1000mg/kg・注射用蒸留水) を強制的に経口投与 (投与量：同上) した。各検体投与前0分、各検体投与後、30、60、90、120、180、240分に採血し、全サンプルを、血糖測定器 (アントセンス/バイエル三共製) を用い、血糖値を測定した。結果を、図1に示す。

つのグループに分け、12週間飼育した後、血糖値を分析した。

【0049】結果を表4に示す。表4の結果から、対照群や、カテキンに比し、プロシアニジンB-3やプロアントシアニジンは、糖尿病ラットの血糖値の上昇を抑制し、糖尿病性合併症の予防や治療に有効と判定された。

【0050】

【0052】図1の結果から、プロアントシアニジンは、経口投与後 (食後)、腸管での糖吸収を抑制することが判る。すなわち、糖尿病性合併症の抑制効果を期待できることが判る。

【0053】

【発明の効果】本発明の糖尿病合併症の予防または治療薬剤は、毒性が少ない特徴を有し、しかも血糖値、血中ヘモグロビン糖化率および血中過酸化脂質を低い値に制御し、種々の糖尿病合併症の発症、進行の予防と治療に有効であると判定される。

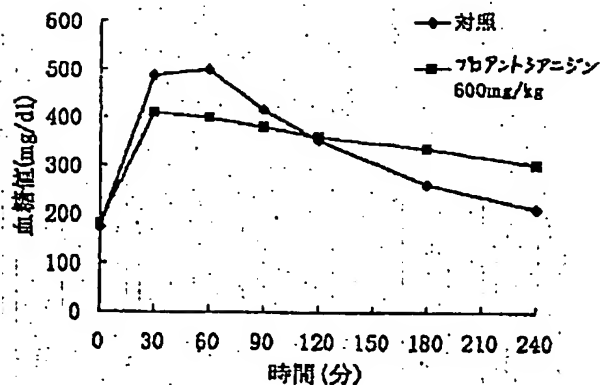
【図面の簡単な説明】

【図1】糖尿病マウスを用いた食後過血糖抑制試験結果を示す。

【図1】

【図1】

糖尿病マウスを用いた食後過血糖抑制試験



フロントページの続き

(51)Int. Cl. 7

C 07 D 311/62

C 07 H 17/065

識別記号

F I

C 07 D 311/62

C 07 H 17/065

テマコード (参考)

(72)発明者 山次 信幸

千葉県野田市野田339番地 キッコーマン
株式会社内

(72)発明者 グュエン・ヴァン・チュエン

東京都町田市真光寺町798-15

Fターム(参考) 4C057 BB02 KK07

4C062 FF44

4C086 AA01 AA02 BA08 EA04 MA01

MA04 NA14 ZA01 ZA33 ZA81

ZC35

4C088 AB56 AC04 BA08 BA32 CA03

NA14 ZA01 ZA33 ZA81 ZC35

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.